

Popularnonaukowy opis badań

Celem mojego projektu doktorskiego jest stworzenie narzędzi molekularnych do badania procesów biologicznych, w które zaangażowana jest struktura końca 5' informacyjnego RNA (mRNA), zwana kapem. Narzędzia te są wykorzystywane do badań struktury i mechanizmu oddziaływań chemicznie modyfikowanego kapu ze specyficznymi białkami i enzymami. Struktura kapu poprzez wiązanie się z różnego rodzaju białkami jest odpowiedzialna za regulację wielu ważnych procesów biologicznych związanych m.in. z produkcją białek w komórce, dzięki czemu posiada znaczny potencjał terapeutyczny. Jej chemiczne modyfikacje zapewniają pożądane właściwości biologiczne i farmakologiczne, takie jak zwiększona trwałość w warunkach komórkowych oraz konkurencyjność z naturalnie występującymi cząsteczkami mRNA. Wyniki uzyskane w toku realizacji projektu pozwolą na zrozumienie wpływu modyfikacji chemicznych na oddziaływania struktury kapu z białkami, a w konsekwencji racjonalne projektowanie nowych jej analogów o właściwościach farmakologicznych, jak również narzędzi do badania procesów biologicznych zależnych od kapu.

Niniejszy projekt składa się z dwóch głównych części, obejmujących syntezę chemiczną modyfikowanych analogów naturalnej struktury kapu oraz badania strukturalne ich kompleksów z białkami metodą krystalografii rentgenowskiej. Do głównych wyzwań części syntetycznej należy opracowanie metody syntezy krótkich fragmentów RNA zakończonych strukturą kapu i jej modyfikowanymi analogami. W tym celu zastosowano podejście modułowe, oparte na łączeniu dwóch fragmentów za pomocą bardzo szybkiej i wydajnej reakcji chemicznej – tzw. „click chemistry”. Wymagało ono przekształcenia kapu oraz fragmentów RNA w odpowiednie reaktywne pochodne. W toku realizacji tej części projektu opracowano metodę syntezy 5'-azydków RNA i zobrazowano jej potencjał w syntezie kapowanych oligonukleotydów oraz innej ważnej, a jednocześnie wymagającej pod względem syntetycznym, klasy związków, jakimi są cykliczne RNA.

Szereg analogów kapu, zawierających różnego rodzaju modyfikacje chemiczne, poddany został kokrystalizacji z dwoma najważniejszymi białkami wiążącymi kap – czynnikiem inicjującym translację eIF4E oraz enzymem hydrolitycznym DcpS, w celu wyznaczenia struktury przestrzennej kompleksów metodą rentgenografii. Uzyskane w ten sposób modele kompleksów przyniosły cenne informacje na temat wpływu modyfikacji chemicznych na geometrię i oddziaływania kapu z białkami. Do najważniejszych wyników badań strukturalnych uzyskanych do tej pory należy wyjaśnienie wpływu modyfikacji β -tiofosforanowej na stabilizację kompleksu kap-eIF4E. Jest to szczególnie istotne w kontekście wykorzystania tego typu analogów do konstrukcji tzw. szczepionek mRNA, będących obiektem badań klinicznych (zakończona 1 faza dla kilku z zastosowań). Na podstawie struktury krystalograficznej udało się też wyjaśnić mechanizm blokowania działania enzymu DcpS (zidentyfikowany jako cel terapeutyczny w leczeniu rdzeniowego zaniku mięśni) przez tioestrowy analog kapu, będący jednym z jego najsilniejszych znanych inhibitorów.

Uzupełnieniem badań krystalograficznych, ułatwiającym analizę i interpretację danych strukturalnych, jest spektroskopia NMR czy izotermiczna kalorymetria miareczkowa (ITC). Pierwsza z tych technik umożliwia m. in. analizę geometrii i równowag konformacyjnych niezwiązanych przez białka analogów kapu w roztworze, podczas gdy ITC dostarcza szczegółowych informacji na temat efektów energetycznych tworzenia kompleksu kap-białko. Informacje te są szczególnie istotne podczas porównywania właściwości analogów o bardzo zbliżonej strukturze.